

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

05.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 3月24日

REC'D 28 MAY 1999
WIPO PCT

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第076055号 09/646135

出願人
Applicant(s):

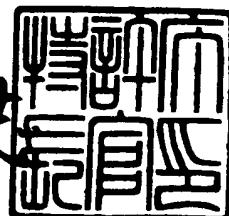
日本新薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月14日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平11-3028441

【書類名】 特許願
【整理番号】 P-402N-LIC
【提出日】 平成10年 3月24日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 9/127
【発明の名称】 肝炎治療剤
【請求項の数】 5
【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 日本新
薬株式会社内
【氏名】 平林 加壽子
【発明者】
【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地 日本新
薬株式会社内
【氏名】 関 純造
【特許出願人】
【識別番号】 000004156
【氏名又は名称】 日本新薬株式会社
【代表者】 市野瀬 浩
【電話番号】 075-321-9086
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 005234
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 肝炎治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カチオン性リポソームと、 $\text{poly}(\text{I:C})$ 、ミスマッチド $\text{poly}(\text{I:C})$ 、 $\text{poly}(\text{A:U})$ 、及びミスマッチド $\text{poly}(\text{A:U})$ からなる群から選択される二本鎖RNAとの複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。

【請求項2】 2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-O-ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体と $\text{poly}(\text{I:C})$ 又はミスマッチド $\text{poly}(\text{I:C})$ の二本鎖RNAとの複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。

【請求項3】 リン脂質がレシチンである請求項2記載の肝炎治療剤又は予防剤。

【請求項4】 二本鎖RNAの平均鎖長が100～500bpの範囲内である請求項1～3のいずれかに記載の肝炎治療剤又は予防剤。

【請求項5】 2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-O-ジオレオイルグリセロール及びレシチンを必須構成成分として形成される薬物担体と、平均鎖長が100～500bpの範囲内である $\text{poly}(\text{I:C})$ との複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、肝炎治療剤に関するものである。

【0002】

ここで、「I」とはイノシン酸を、「C」とはシチジル酸を、「A」とはアデニル酸を、「U」とはウリジル酸を、それぞれ意味する。

ミスマッチド $\text{poly}(\text{I:C})$ 、ミスマッチド $\text{poly}(\text{A:U})$ とは、当業者に周知の事項であるが、二本鎖を構成する核酸塩基の中に一部相補的でない塩基を含む $\text{poly}(\text{I:C})$ 、 $\text{poly}(\text{A:U})$ を意味する。

【0003】

【従来の技術】

poly (I : C) は、ポリイノシン酸とポリシチジル酸とからなる二本鎖RNAであり、インターフェロン誘導能と免疫賦活作用を有する薬物として広く知られている。

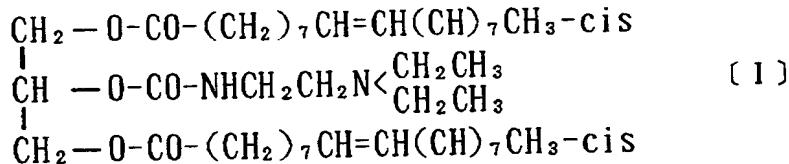
インターフェロンそのものは、現在、C型肝炎の治療に有効であると報告されている（例、肝胆膵、9(4), 611 (1984)、同 13(1), 123 (1986)、同 12(5), 809 (1986)、同 23(5), 1065 (1991)）。しかし、かかるインターフェロンを誘導することができる上記poly (I : C) を肝炎の治療に用いることは、その誘導量の程度や毒性等から困難であると考えられている。

【0004】

一方、いわゆるカチオン性リポソームと一般に呼ばれる、リポフェクチン（登録商標）なる薬物担体や下記の構造式〔I〕に係る2-O-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-O-ジオレオイルグリセロール等のグリセロール誘導体とリン脂質とを必須構成成分として形成される薬物担体等が知られている（例、PCT WO91/17424公報、PCT WO94/19314公報）。

【0005】

【化1】



【0006】

上記カチオン性リポソームは、脂質二分子膜からなる、水溶液中で正電荷を持った小胞体であると考えられている。かかるカチオン性リポソームは水溶液中で正電荷を帯び、poly (I : C) 等の二本鎖RNAは水溶液中で負電荷を帯びることから、カチオン性リポソームとpoly (I : C) 等とは容易に複合体を

形成することができる。

このような薬物担体と p o l y (I : C) 等の二本鎖RNAとの複合体が肝炎の治療等に有効であることは全く知られていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、肝炎の治療や予防に有効な新規な薬剤を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、カチオン性リポソームのような薬物担体と p o l y (I : C) 等の二本鎖RNAとの複合体が、肝臓や脾臓に特異的に有効量のインターフェロンを長時間誘導し得ることを初めて見出し、本発明を完成した。

【0009】

本発明は、一つには、カチオン性リポソームと p o l y (I : C) 等の二本鎖RNAとの複合体（以下「本複合体」という）を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤（以下「本発明製剤」という）である。

以下、本発明を詳述する。

【0010】

「カチオン性リポソーム」としては、リポフェクチン（登録商標）、リポフェクトアミン（登録商標）、リポフェクトエース（登録商標）、DMRIE-C（登録商標）の他に、PCT WO94/19314公報に開示されている薬物担体、例えば、前記化学式 [I] の2-0-(2-ジエチルアミノエチル)カルバモイル-1,3-0-ジオレオイルグリセロール（以下「化合物A」という）及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体などを挙げることができる。

本発明において、好ましいカチオン性リポソームとしては、化合物A及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体（以下、この薬物担体を「本担体」という）を挙げることができる。

【0011】

本発明に適用しうる二本鎖RNAとしては、例えば、p o l y (I : C) 、ミ

スマッチド poly (I : C) 、 poly (A : U) 、ミスマッチド poly (A : U) を挙げることができる。この中、 poly (I : C) が適当である。

【0012】

上記二本鎖 RNA の鎖長は、特に制限されないが、 50~2,000bp (bp : ベースペアー、塩基対数) の範囲にあるものが適当であり、 100~500bp の範囲にあるものが好ましく、 150~250bp の範囲にあるものがより好ましい。 50bp未満であると有効性に問題が生じるおそれがあり、 2,000bp より長いと安全性に問題が生じるおそれがある。 150~250bp の範囲のものは、本発明において最も有効性と安全性とのバランスがとれている鎖長領域であると考えられる。 poly (I : C) についても 100~500bp の範囲にあるものが好ましく、 150~250bp の範囲にあるものがより好ましい。なお、 poly (I : C) 等は、通常様々な鎖長からなる一定の分布をもって存在するので、前記各鎖長は最大分布の塩基対数を意味し、ここでは「平均鎖長」という。

【0013】

本担体中のリン脂質としては、医薬上許容されるリン脂質であれば特に制限されず、具体例として、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、レシチン等を挙げることができる。また、水素添加されたリン脂質も挙げることができる。好ましいリン脂質としては、卵黄ホスファチジルコリン、卵黄レシチン、大豆レシチン、卵黄ホスファチドを挙げができる。 2 種以上のリン脂質を用いることもできる。なお、化合物 A においては、ホスファチジルコリン又はレシチンの方が、カチオン性リポソームにおいて一般的に用いられるホスファチジルエタノールアミンよりも優れている。

【0014】

好ましい本発明としては、従って、化合物 A 及びレシチンを必須構成成分として形成される薬物担体、即ち、リン脂質がレシチンである本担体と、平均鎖長が 100~500bp (特に 150~250bp) の範囲内にある poly (I : C) との複合体に係る本発明製剤を挙げができる。

【0015】

カチオン性リポソームと二本鎖RNAとの構成比率は、カチオン性リポソームや二本鎖RNAの種類や鎖長、肝炎の種類や程度等によって異なるが、カチオン性リポソーム10重量部に対して、二本鎖RNA0.05～10重量部が適当であり、0.1～4重量部が好ましく、0.5～2重量部がより好ましい。本担体とpoly(I:C)との構成比率も同様に、本担体10重量部に対して、poly(I:C)0.05～10重量部が適当であり、0.1～4重量部が好ましく、0.5～2重量部がより好ましい。

【0016】

本担体中の、化合物Aとリン脂質との構成比率は、二本鎖RNAの種類や鎖長、使用量、またリン脂質の種類等によって異なるが、化合物A1重量部に対して、リン脂質0.1～10重量部が適当であり、0.5～5重量部が好ましく、1～2重量部がより好ましい。

【0017】

本発明製剤は、例えば、本複合体が水溶液中に分散している液剤（注射剤、点滴剤等）やその凍結乾燥製剤の形態をとることができる。液剤の場合、本複合体が、0.001～25% (w/v)の濃度範囲内で存在しているものが適当であり、0.01～5% (w/v)の濃度範囲内で存在しているものが好ましく、0.1～1% (w/v)の濃度範囲内で存在しているものがより好ましい。

【0018】

本発明製剤は、医薬上許容される任意の添加剤、例えば、乳化補助剤、安定化剤、等張化剤、pH調整剤を適当量含有していてよい。具体的には、炭素数6～22の脂肪酸（例、カプリル酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸）やその医薬上許容される塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩）、アルブミン、デキストラン等の乳化補助剤、コレステロール、ホスファチジン酸等の安定化剤、塩化ナトリウム、グルコース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース等の等張化剤、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、トリエタノールアミン等のpH調整剤などを

挙げることができる。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明製剤は、例えば、カチオン性リポソーム又はその原料（例えば、化合物Aとリン脂質）とp o l y (I : C) 等の二本鎖RNAとを水溶液中で分散処理することにより製造することができる。水溶液としては、注射用水、注射用蒸留水、生理食塩水等の電解質液、ブドウ糖液等を挙げることができる。分散処理は、適当な分散機、例えば、ホモミキサー、ホモジナイザー、超音波分散器、超音波ホモジナイザー、高圧乳化分散機、マイクロフルイダイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントンーガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて行うことができる。また、当該分散処理は、粗分散を経るなど数段階に分けて行うこともできる。

【0020】

カチオン性リポソームは、市販のものをそのまま又は適当に加工して用いることができる。

【0021】

カチオン性リポソームの原料から本発明製剤を製造する場合は、当該原料にp o l y (I : C) 等の二本鎖RNAを加え、一緒に分散処理することができる他、当該原料をまず分散処理してカチオン性リポソームを形成させ、続いてp o l y (I : C) 等の二本鎖RNAを加え再度分散処理して本発明製剤を製造するともできる。

【0022】

医薬上許容される任意の添加剤は、分散前でも分散後でも適当な工程で添加することができる。

【0023】

次いで、上記分散処理して得られた本発明製剤を凍結乾燥処理すれば、本発明製剤の凍結乾燥製剤を調製することができる。凍結乾燥処理は、常法により行なうことができる。例えば、上記分散処理して得られた本発明製剤を滅菌後、所定量をバイアル瓶に分注する。約-40~-20℃の条件で予備凍結を約2時間程

度行い、約0～10℃で減圧下に一次乾燥を行い、次いで、約15～25℃で減圧下に二次乾燥して凍結乾燥する。そして、一般的にはバイアル内部を窒素ガスで置換し、打栓して本発明製剤の凍結乾燥製剤を得る。

【0024】

本発明製剤の凍結乾燥製剤は、一般には任意の適当な溶液（再溶解液）の添加によって再溶解し使用することができる。このような再溶解液としては、注射用水、生理食塩水等の電解質液、ブドウ糖液、その他一般輸液を挙げることができる。この再溶解液の液量は、用途等によって異なり特に制限されないが、凍結乾燥前の液量の0.5～2倍量、又は500mL以下が適当である。

【0025】

本発明製剤は、pol y (I : C) 等の二本鎖RNAを単独で投与する場合よりも肝臓や脾臓で特異的に、しかも β インターフェロンを多量に誘導することができると共に、長時間 β インターフェロンを誘導することができるので、ヒトを含む動物の肝炎の治療又は予防に有効である。また、化合物A及びレシチンを必須構成成分として形成される薬物担体、即ち、リン脂質がレシチンである本担体と、平均鎖長が100～500bp（特に150～250bp）の範囲内にあるpol y (I : C)との複合体に係る本発明製剤は、有効性を保持しつつ毒性が極めて低いので、とりわけ優れている。

本発明製剤は、例えば、静脈内投与、経粘膜投与、肝動脈内投与することができる。

【0026】

本発明製剤の肝炎治療のための投与量は、二本鎖RNAやリン脂質の種類、肝炎の種類や進行状況、患者の年齢、動物差、投与経路、投与方法等によって異なるが、二本鎖RNAの投与量として、1回当たり通常1 μ g～50mg/ヒトが適当であり、10 μ g～10mg/ヒトが好ましい。pol y (I : C)の投与量としても、1回当たり通常1 μ g～50mg/ヒトが適当であり、10 μ g～10mg/ヒトが好ましい。本発明製剤は、1日1～3回を、連日、隔日、1週毎、2週毎等に1ショット投与や点滴投与等することができる。

【0027】

【実施例】

以下、実施例及び試験例を掲げて、本発明を更に詳しく説明する。各実施例及び各試験例では、平均鎖長がほぼ 200bp の pol y (I : C) の二本鎖 RNA を用いた。本発明製剤の濃度は、すべて本発明製剤中の当該 pol y (I : C) の濃度で表している。

【0028】

実施例 1

化合物 A 2 g と精製卵黄レシチン 2 g に 100mL の注射用水に溶解したマルトース 40 g を加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて 5 分間分散処理して本担体の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験用小型乳化分散機を用いて 1 時間分散処理し、注射用水で 250 mL に定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液 250 mL に 500 mg の pol y (I : C) を含む 150 mL の水溶液を攪拌しながら添加し、更に 1 時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。その後、本発明製剤を 1 mL づつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。

【0029】

実施例 2

化合物 A 50 g と卵黄ホスファチド 30 g に 10 L の注射用水に溶解したスクロース 4 kg を加えマントンーガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて 10 分間分散処理し、注射用水で 25 L に定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液 20 L に 10 g の pol y (I : C) を含む 12 L の水溶液を攪拌しながら添加し、塩酸を用いて pH を 5.5 に調整し、さらに 30 分マントンーガウリン型高圧ホモジナイザーを用いて分散処理して本発明製剤を得た。その後、本発明製剤を 20 mL づつバイアルに分注し常法に従って凍結乾燥製剤とした。当該凍結乾燥製剤に市販の 5 % ブドウ糖輸液 (500 mL) を加えて溶解した。

【0030】

実施例 3

化合物 A 2 g と大豆レシチン 2 g に 100 mL の注射用水に溶解したブドウ糖

20gを加え攪拌混合し、ホモジナイザーを用いて5分間分散処理して本担体の粗分散液を得た。かかる粗分散液を更に実験用小型高压乳化分散機を用いて1時間分散処理し、注射用水で250mLに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液250mLに50mgのpol y (I : C) を含む150mLの水溶液を攪拌しながら添加し、さらに1時間実験用小型高压乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。

【0031】

実施例4

化合物A 1. 2gと精製卵黄レシチン2. 0gに100mLの注射用水に溶解したマルトース40gを加え攪拌混合し、実験用小型乳化分散機を用いて30分間分散処理し、注射用水で250mLに定容して本担体分散液を回収した。本担体分散液250mLに200mgのpol y (I : C) を含む150mLの水溶液を攪拌しながら添加し、さらに2時間実験用小型乳化分散機を用いて分散処理して本発明製剤を得た。

【0032】

試験例1 マウスの肝臓における β インターフェロン誘導効果 (in vivo)

雄性マウス (Balb/c, 5週齢) 一群3匹に実施例4に係る本発明製剤又は対照としてのpol y (I : C) 単独製剤を静脈内投与し、3時間後に肝臓を摘出した。そして、全RNAを抽出し、RT-PCR法で β インターフェロンのmRNA発現量を調べた。その結果を図1に示す。

図1から明らかなように、いずれも濃度依存的に β インターフェロンを誘導しているが、pol y (I : C) 単独投与に比べて本発明製剤の方がより強かった。

【0033】

試験例2 肝臓以外の臓器での β インターフェロン誘導効果 (in vivo)

試験例1と同様にして肝臓以外の臓器での β インターフェロンのmRNA発現量を調べた。その結果を図2に示す。

図2から明らかなように、本発明製剤は、腎臓、肺、及び脳において β インターフェロンをあまり誘導しなかった。

上記試験例1及び2の結果から、poly(I:C)単独投与では、臓器特異性は見られなかつたが、本発明製剤では、肝臓及び脾臓で β インターフェロンを強く誘導した。

【0034】

試験例3 マウス血清中のインターフェロン量 (in vivo)

雄性マウス (Balb/c, 5週齢) 一群3匹に実施例4に係る本発明製剤又は対照としてpoly(I:C)単独製剤を静脈内投与し、3時間後に採血して血清を得た。そして、L929細胞のウイルス (VSV) 感染による変性阻止によって血清中のインターフェロン量を測定した。その結果を表1に示す。

【0035】

【表1】

マウス血清中のインターフェロン量

	投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	インターフェロン量 (I.U./ml)
コントロール	-	<3
実施例4	10	13±2
	30	41±1
	100	63±18
poly(I:C) 単独	10	<3
	30	5±2
	100	18±6

【0036】

表1から明らかなように、いずれも投与量依存的に血清中のインターフェロンが検出されたが、本発明製剤を投与した方がより多くのインターフェロンが検出された。

本発明製剤の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の3時間後のインターフェロン量は63 I.U./mlであり、24時間後でも30 I.U./mlあった。これは、ヒト臨床において 3×10^6 I.U. の β インターフェロンを投与した場合、投与直後の血中濃度は67 I.U./mlであり、45分後には検出されなくなることが報告されていることから、本発明製剤が臨床的にも十分量のインターフェロンを持続的に誘導できる可能性を示している。

【0037】

試験例4 毒性試験

(1) ラット単回投与による肝毒性の発現（急性毒性試験）

6週齢SD雄性ラット8匹について実施例4に係る本発明製剤の単回静脈内投与を行い、20時間後の血清アミノアシルトランスフェラーゼ活性を測定した。その結果、5mg/kg

まで死亡例は見られず、5mg/kgで軽度の血清アミノアシルトランスフェラーゼの上昇が見られ

た程度であった。1mg/kgでは血清アミノアシルトランスフェラーゼの上昇はほとんどなかつた。

(2) ラット2週間限定亜急性毒性試験

実施例4に係る本発明製剤について、SD雄性ラット6匹(6週齢)に14日間連日静脈内投与したところ、1mg/kg以下では特に問題となる毒性は見られなかった。

【0038】

(3) 抗原性試験

実施例4に係る本発明製剤について、雄性モルモット(hartley, 5週齢)を用い抗原性試験を実施したところ、50μg/モルモットで抗原性は認められなかった。

(4) 簡易変異原性試験

実施例4に係る本発明製剤について、簡易復帰突然変異試験および簡易染色体異常試験を実施したところ、10μg/mlで変異原性は認められなかった。

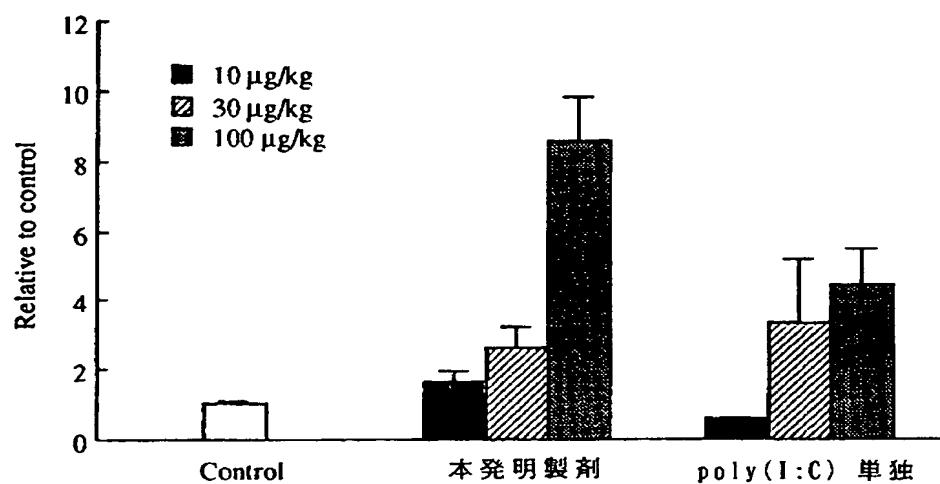
【図面の簡単な説明】

【図1】マウスの肝臓におけるβインターフェロンのmRNAの発現量を示す。左端の1カラムはコントロールを表す。中央の3カラムは実施例4に係る本発明製剤の投与結果を表し、左から順に10μg/kg、30μg/kg、100μg/kg投与群を表す。右端の3カラムはpoly(I:C)単独投与結果を表し、左から順に10μg/kg、30μg/kg、100μg/kg投与群を表す。縦軸は、コントロールに対する薬物投与群のβインターフェロンmRNAの発現量比を表す。

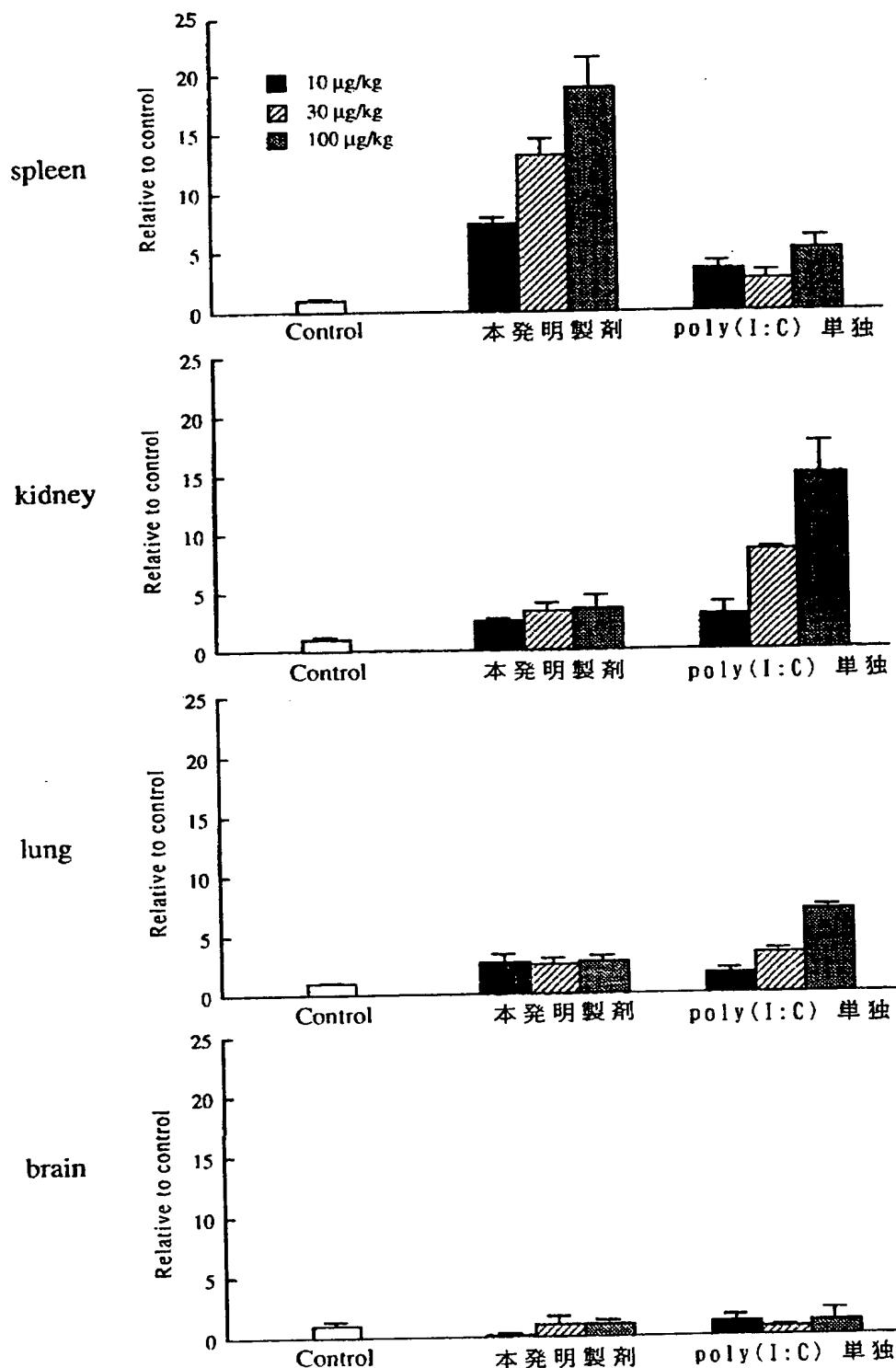
【図2】マウスの各臓器（上から順に脾臓、腎臓、肺、脳）における β インターフェロンのmRNAの発現量を示す。左端の各1カラムはコントロールを表す。中央の各3カラムは実施例4に係る本発明製剤の投与結果を表し、左から順に $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $30\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 投与群を表す。右端の各3カラムはpoly(I:C)単独投与結果を表し、左から順に $10\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $30\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 投与群を表す。縦軸は、コントロールに対する薬物投与群の β インターフェロンmRNAの発現量比を表す。

【書類名】 図面

【図1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 肝炎の治療や予防に有効な新規な薬剤を提供することにある。

【解決手段】 例えば、2-0-(2- ジエチルアミノエチル) カルバモイル-1,3-0- ジオレオイルグリセロール及びリン脂質を必須構成成分として形成される薬物担体と poly (I : C) との複合体を含有することを特徴とする肝炎治療剤又は予防剤。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人
【識別番号】 000004156
【住所又は居所】 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地
【氏名又は名称】 日本新葉株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [00004156]

1. 変更年月日 1990年 8月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市南区吉祥院西ノ庄門口町14番地
氏 名 日本新薬株式会社

